Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen.
Vorstand: Professor Dr. A. Dietrich.

Fernwirkungen in der Gewebskultur durch Vitamin D und vitaminhaltige Oele.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
vorgelegt von

Kurt Hörger
aus Heilbronn a. N.

1933

Gatzer & Hahn, Graphische Werkstätten, Schramberg (Schwarzwald)

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät
der Universität Tübingen.

Dekan: Prof. Dr. Wolf.
Berichterstatter: Prof. Dr. M. Nordmann.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhalts-Verzeichnis.

I. Einleitung.
II. Bedingungen zur Bewertung der Versuchsergebnisse und die Kontrollkulturen.
III. Methode.
IV. Versuche:
    1. Mit unbestrahltem und bestrahltem Ergosterin (Vitamin D).
        a) in Kristallform.
        b) in öliger Lösung.
        c) in Form von Vigantol.
    2. Mit vitaminhaltigen Oelen.
        a) bestrahltes und unbestrahltes Sesamöl.
        b) bestrahltes und unbestrahltes Leinöl.
V. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.
VI. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548026_0025

I. Einleitung.

In der Geschichte der Vitaminforschung wurde die große Bedeutung des Vitamins D für den Organismus in der experimentellen Biologie häufig dargestellt, dagegen weist das Schrifttum über die Wirkung dieses Vitamins auf Wachstum und Stoffwechsel der Gewebezellen in vitro keinerlei Angaben auf. In der Gewebezüchtung, wo die komplizierenden Einflüsse des Organismus fehlen, kann die Wirkung eines solch neuen Faktors auf das Explantat bei sonst konstanten Bedingungen leicht beobachtet werden. Das Ergebnis einer solchen Untersuchung gibt einerseits neuen Aufschluß über die Natur der zugesetzten Substanz und über die Art ihrer Einwirkung auf lebendes und wachsendes Gewebe, andererseits zeigt es, welche Gewebsformen und in welchem Sinne sie auf diesen Einfluß reagieren.

Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen wurde das Vitamin D als neuer Faktor in wechselnder Anordnung den Kulturen zugesetzt. Zu diesen Untersuchungen veranlaßten uns die Feststellungen von Dietrich-Sander, die das Vitamin D im Tierexperiment verwendeten. Hier wurde es in Form von bestrahltem Ergosterin am Kaninchenohr unter die Haut eingespritzt; daraus ergab sich bei der histologischen Untersuchung ein eigenartiger Befund im Gegensatz zum sogenannten Kontrollohr, an dem mit unbestrahltem Ergosterin in gleicher Weise verfahren wurde. An der Einspritzungsstelle fand sich mit Regelmäßigkeit eine Epithelcyste und eine Vermehrung des Epithels der Haut und der Talgdrüsen in der Umgebung dieser Cyste.

Diese fördernde Beeinflussung des Wachstums in der Umgebung sollte an der Gewebskultur durch Zusatz von reinem Vitamin D in geeigneter Anordnung dargestellt und beobachtet werden.

II. Bedingungen zur Bewertung der Versuchsergebnisse und die Kontrollkulturen.

Um zuverlässige Ergebnisse bekommen zu können, wurde die schon von Nordmann vielfach angewandte und dargestellte Explantation von Leber des Säugetier-Embryos gewählt (s. Lit.Verz.). Die damals gemachten Beobachtungen über das normale Wachstum der Leberzellen in vitro versetzten uns in die Lage, die durch Vitaminzusatz bedingten Abweichungen schon in den ersten Anfängen zu erkennen und sie prognostisch zu beurteilen. Diese Erfahrungen kamen hauptsächlich bei der Bewertung geringfügiger Unterschiede zu den Kontrollkulturen sehr zu statten. Die unten beschriebene Methode der Deckglaskulturen ermöglichte durch regelmäßige mikroskopische Untersuchung eine sorgfältige Beobachtung des Wachstums und einen genauen Vergleich mit den Kontrollkulturen. Der Befund jeder einzelnen Kultur wurde täglich notiert. Geringfügige Unterschiede in Art und Geschwindigkeit des Wachstums wurden erst dann als Ergebnis gewertet, wenn sie sich in den folgenden Tagen bestätigten und sich in der betreffenden Reihe als regelmäßig erwiesen. Diese Ergebnisse wurden dann in den später angelegten Kulturserien nachgeprüft.

In jeder Serie wurde eine Reihe von Kontrollkulturen ohne Zusatz von Vitamin D bzw. mit einem Zusatz von unbestrahltem Ergosterin angelegt, um zufällige Störungen oder Begünstigungen des Wachstums, die in der Behandlung, Anlegung, im Alter dem embryonalen Gewebes, in der Zusammensetzung des Nährmediums usw. begründet sein können, sicher zu erkennen. Trotz der Verschiedenheit dieser Faktoren, die das Wachstum beeinflussen können, zeigten die Kontrollkulturen eine weitgehende Gleichartigkeit. Unterschiede, die sich beim Vergleich mit ihnen ergaben, waren vom zweiten Tag ab meistens sehr leicht festzustellen, weil sie mit größter Regelmäßigkeit ein ihnen eigenes, charakteristisches Aussehen darboten, das durch die Art ihres Wachstums bedingt ist, sodaß

man von einem Wachstumstypus der Kontrollkulturen sprechen konnte, wie er von Nordmann beschrieben wurde (s. Lit.-Verz.). Das Explantat grenzt sich zunächst scharf gegen die Umgebung ab, als Reaktion treten Makrophagen und Erythrocyten im Medium auf. Als Zeichen beginnenden Wachstums schieben sich allmählich transparente Plasmafortsätze, sog. Fibrocytenspitzen, über den Rand der Kultur vor und entwickeln sich ringsum zu einem Kranz von Fibrocyten in strahlenförmiger Anordnung. Diesen folgen am 2. bzw. 3. Tag einzelne Epithelmembranen, die sich sehr selten zu einem Kranz schließen und im Wachstum immer hinter den Fibrocyten zurückbleiben. Vom 4. oder 5. Tag ab, während Wachstumsstillstand, Verfettung und langsamer Zerfall der Epithelmembranen erfolgt, überwuchern die Fibrocyten.

Die Zahl der gemachten Versuche beläuft sich, einschließlich der angelegten Kontrollkulturen, auf etwa 600 Kulturen.

III. Methode.

In der Gewebskultur weisen bekanntlich die Zellen, vor allem die Epithelien, der Säugetiere ein relativ spärliches Wachstum auf. Aus diesem Grunde erschien gerade solches Gewebe geeignet, einen Unterschied in der Größe der Wachstumszone zu erkennen und eine etwa vorhandene Wachstumsbegünstigung einer der beiden Zellarten, Epithel oder Bindegewebe, zu beobachten. Außerdem bestand schon eine ausführliche Darstellung von Nordmann: „Ueber Wachstum und Stoffwechsel der Leberzellen in der Gewebskultur", dessen Erfahrungen diese Untersuchungen wesentlich erleichterten.

Als Explantat wurde Lebergewebe vom Meerschweinchen-Embryo etwa aus der Mitte der Schwangerschaft verwendet.

Das Gewebe wurde in einfachen Deckglaskulturen ausgesetzt und hatte als Nährmedium ein Gemisch von gleichen Teilen Tyrodelösung und frischem, arteigenem Plasma. Um möglichst

konstante Bedingungen zu haben, wurden weitere Zusätze von wachstumsfördernden Mitteln, wie Embryonalextrakt u. a., vermieden und nur die zu prüfende vitaminhaltige Substanz in verschiedener Anordnung beigegeben, und zwar wurde sie sowohl in das Nährmedium selbst, als auch außerhalb desselben, nämlich unter die Kultur in den Hohlschliff des Objektträgers gebracht.

Bei jeder Serie wurden 30—40 Kulturen angelegt, davon 5—10 als Kontrollkulturen, die übrigen ebenfalls in Reihen von je 5—10 Kulturen mit einem Vitaminzusatz von verschiedener Menge in Kristallform oder in öliger Lösung von wechselnder Konzentration. Sie wurden ohne weiteren Eingriff 5—6 Tage lang regelmäßig beobachtet und untereinander und mit den Befunden der vorhergegangenen verglichen; dabei war der 3. oder 4. Tag entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit des Lebergewebes für den Vergleich am geeignetsten, und ergab die deutlichsten Unterschiede.

Folgende Substanzen wurden geprüft: Reines kristallinisches bestrahltes und unbestrahltes Ergosterin, in reinem Sesamöl gelöstes bestrahltes und unbestrahltes Ergosterin in mehreren Konzentrationen als Tropfen im Medium und in der Tiefe des Hohlschliffs, in gleicher Weise bestrahltes und unbestrahltes Sesamöl, bestrahltes und unbestrahltes Leinöl in mehrfachen Verdünnungen, sowie die Handelsware Vigantol.

Die Reindarstellung des Vitamins D erfolgte nach dem Verfahren von Haffner u. Pulewka (s. Lit.Verz.). Die Bestrahlung der Oele erfolgte durch die Hanauer Quarzlampe in etwa 10 cm Abstand in 6×10 Minuten mit kurzen Unterbrechungen.

IV. Versuche.

1. Mit unbestrahltem und bestrahltem Ergosterin (Vitamin D).

a) in Kristallform:

Die Kristalle des unbestrahlten Ergosterins blieben auf das Wachstum in jeder Anordnung und Menge vollkommen wirkungslos. Sie zeigten alle den Wachstumstyp der Kontrollkultur, gleichgültig, ob die Kristalle in unmittelbarer Nähe des Explantats, nämlich in das Nährmedium, gebracht wurden, oder ob sie in entsprechender Entfernung in der Tiefe des Hohlschliffs angeordnet waren.

Die Kristalle des bestrahlten Ergosterins (Vitamin D) zeigten in auffallendem Gegensatz dazu auch in viel geringerer Menge eine sofortige starke Wirkung. Wurden sie dem Plasma zugefügt, so trat sofortige Nekrose des Gewebes ohne Reaktion ein; befanden sie sich in der Tiefe des Hohlschliffs, so gingen diese Kulturen ebenfalls regelmäßig zu Grunde, ohne daß eine Reaktion mit dem umgebenden Medium als erstes Anzeichen einer lebenden Kultur zu beobachten war.

Um die abtötende Wirkung des bestrahlten Ergosterins aufzuhalten, wurde versucht, die Kristalle mit Splittern von Deckgläsern im Hohlschliff abzudecken. Dabei war eine Schädigung ebenfalls sofort zu erkennen, die Nekrose trat jedoch mit Verzögerung ein, die im Verhältnis stand zu der Menge der eingelagerten Kristalle und zu der Vollständigkeit, mit der die Kristalle vom Deckglassplitter bedeckt waren. So wurden einige Kulturen nach sehr schwacher Reaktion vernichtet, andere zeigten geringe Ansätze zu dürftigem Wachstum, wurden aber spätestens am 3. Tage in der ganzen Reihe mit großer Regelmäßigkeit nekrotisch.

Würden die Kristalle dagegen in nächster Nähe, aber vollständig durch ein Deckglas von der Kultur getrennt, nämlich außerhalb der feuchten Kammer auf das Deckglas gelegt, so war

keine Beeinträchtigung des Wachstums festzustellen. Diese Kulturen glichen den Kontrollkulturen.

Durch starke Verminderung der kristallinischen Substanz in der Tiefe des Hohlschliffs ist es ebenfalls nicht gelungen, die sofort einsetzende Nekrose zu verhindern. Es wurde deshalb versucht, die Einwirkung des Vitamins aus dieser Entfernung zeitlich zu begrenzen. Dabei wurde die Wirkung in der Weise dosiert, daß die Deckgläser mit der Kultur im hängenden Tropfen nach verschiedenen Zeiten der Einwirkung auf einen neuen Objektträger mit leerem Hohlschliff gebracht und weiter kontrolliert wurden. Dabei war folgende deutliche Abstufung im Wachstum zu beobachten:

Nach 1—2stündiger Einwirkung einer möglichst kleinen Menge war das Wachstum zunächst deutlich gehemmt, in späteren Tagen jedoch war es wie das der Kontrollkulturen oder blieb nur wenig hinter diesen zurück.

Nach 3stündiger Einwirkung setzten sie zu spärlichem Wachstum an oder verfielen nach normaler Reaktion allmählich der Nekrose.

Diese Reihen waren jedoch in ihren Ergebnissen sehr wenig einheitlich, da manche den Kontrollkulturen nicht mehr nachstanden oder besser erschienen, andere mehr oder weniger rasch der Nekrose verfielen. Diese Unbeständigkeit, oft innerhalb derselben Untersuchungsreihe, kann in der Größe des explantierten Gewebsstückes, in der schweren Dosierbarkeit der kristallinischen Substanz oder in den oben erwähnten Faktoren ihre Ursache haben. Trotzdem war in diesen Reihen eine Abstufung gegen die kürzeren Einwirkungszeiten noch festzustellen.

Nach 5—6 Stunden dauernder Einwirkung reagierte das Gewebe, war jedoch stark gegen die Umgebung abgesetzt. Die ausgewanderten Makrophagen erschienen geschädigt und stark verfettet. Nach 24 Stunden waren die Kulturen dieser Versuchsreihe regelmäßig tot.

Bei den Versuchen mit kristallinischem Vitamin D wurden verschiedene Arten des Wachstums vorgefunden, die in den im folgenden beschriebenen Versuchen bei Einwirkung der Substanz aus der Tiefe des Hohlschliffs immer wieder auftraten, gleichgültig, in welcher Gestalt das Vitamin bei dieser Versuchsanordnung verwendet wurde. Es waren 3 Arten zu unterscheiden:

1. Nekrose ohne jegliche erkennbare Reaktion.
2. Nekrose nach anfänglicher Reaktion: Zunächst scharfe Abgrenzung, dann in Form ausgewanderter Makrophagen und austretender roter Blutkörperchen in die Umgebung.
3. Nekrose nach anfänglichem, spärlichem Wachstum.

Diese Versuchsreihen haben ergeben, daß Kristalle unbestrahltem Ergosterins in keiner Anordnung und in keiner hier verwendbaren Menge einen erkennbaren Einfluß auf das Wachstum einer Gewebskultur ausübte; daß dagegen kristallinisches, bestrahltes Ergosterin unter gleichen Bedingungen auch in geringerer Menge abtötend wirkte. Diese sofort einsetzende Nekrose des Gewebes konnte durch Abdeckung der Kristalle oder durch zeitliche Begrenzung ihrer Einwirkung verzögert werden. Diese schädigende Wirkung des Vitamins war durch kurzfristige Fernwirkung so abzuschwächen, daß die Kulturen keinen Unterschied zu den Kontrollkulturen aufwiesen. Eine Wachstumssteigerung war auf diese Weise allerdings nicht zu erzielen.

b) in Sesamöl gelöst:

Ein Tropfen einer 1%igen Lösung unbestrahlten Ergosterins zeigt aus der Tiefe des Hohlschliffs und bei Vermischung mit dem Plasma keine Beeinflussung des Wachstums der Kulturen, die wie die Kontrollen wuchsen; demnach erwies sich auch das Lösungsmittel als wirkungslos.

Ein Tropfen einer 1%igen Lösung von bestrahltem Ergosterin bewirkte dagegen, genau so wie in Kristallform, im Plasma sofortige Nekrose ohne vorausgehende Reaktion.

Auffallend unterschied sich aber von den Versuchen mit kristallinischer Substanz die Anbringung eines solchen Tropfens in die Tiefe des Hohlschliffs. Diese Reihen zeigten keine Einheitlichkeit mehr: Einige der Kulturen zerfielen erst nach anfänglicher Reaktion, die meisten aber erschienen beim Vergleich mit den Kontrollkulturen rascher gewachsen. Demnach wäre bei dieser Konzentration auf eine schwankende Grenze zwischen Schädigung und Förderung zu schließen, sodaß bei geeigneter Dosierung eine einheitliche deutliche Wachstumsbegünstigung erzielt werden könnte. Dabei wäre allerdings zu beachten, daß frisch bestrahltes Ergosterin in seiner biologischen Wirkung am stärksten ist und mit der Zeit an Intensität verliert.

Ein Tropfen einer $^1/_2$%igen Lösung bestrahlten Ergosterins verursachte ebenfalls noch gelegentlich eine Beeinträchtigung, wenn das Vitamin in frisch-bereitetem Zustand verwendet wurde. In der Wachstumszone dieser Kulturen waren keine Fibrocyten zu erkennen, sondern eigenartigerweise nur kleine, sehr langsam wachsende rasch verfettende, zapfenartige Epithelmembranen. Bei der Mehrzahl bestand jedoch in dieser Konzentration die Wachstumszone aus großen, breitbasigen transparenten Membranen aus Epithel, die oft mit den im Wachstum anscheinend gehemmten Fibrocyten Schritt hielten und die die Kontrollkulturen sowohl an Ausdehnung der Wachstumszonen überragten, als auch das Verhältnis von Epithel zu Bindegewebe zu Gunsten des Epithels änderten; dabei wäre das Fibrocytenwachstum gehemmt, während das Epithel ungehindert wachsen konnte, oder es wäre nicht in demselben Maße gefördert worden.

Ein Tropfen einer $^1/_4$-, $^1/_8$- oder $^1/_{16}$%-Lösung von bestrahltem Ergosterin bewirkte aus dieser Entfernung mit Regelmäßigkeit eine Wachstumssteigerung, ohne daß Unterschiede zwischen diesen Konzentrationen festzustellen gewesen wären. Ungefähr 80% dieser Kulturen waren in der oben beschriebenen Weise den Kontrollen überlegen und erwiesen sich als die besten Wachstumstypen.

Die eigenartige Wachstumsform bei Verwendung von $^1/_2$%iger Lösung mit fehlendem Fibrocytenwachstum und verkümmerten Epithelmembranen hat sich prognostisch als schlechter erwiesen wie die Kontrollkulturen. Es scheint sich hier um eine allgemeine Hemmung des Wachstums zu handeln mit hauptsächlicher Schädigung des Bindegewebes.

Durch die Lösung in Sesamöl ist es also gelungen, die in den vorhergehenden Kulturserien vergeblich versuchte Abschwächung der nekrotisierenden oder hemmenden Wirkung zu erreichen, wobei diese bei geeigneter Dosierung zu einem wachstumsfördernden, bzw. epithelwachstumsfördernden Einfluß wurde.

Diese Versuche mit in Sesamöl gelöstem Ergosterin haben ergeben, daß es in unbestrahltem Zustand mit der Plasma vermischt und aus der Tiefe des Hohlschliffs ebenfalls wirkungslos blieb. Im Gegensatz dazu wirkte bestrahltes Ergosterin in verschieden konzentrierter Lösung auch verschieden:

Ein Tropfen einer hochkonzentrierten Lösung (1%ig) bewirkte zunächst eine geringe Begünstigung bei älter bestrahltem, teilweise Nekrose bei frisch bestrahltem Ergosterin. Bei weiterer Verdünnung ($^1/_2$—$^1/_{16}$%ig) ergab sich eine auffallende Förderung des Wachstums im allgemeinen und des epithelialen im besonderen aus dieser Entfernung.

Ueber die Natur des Vitamins D in biologischer Hinsicht ergab sich:

1. Daß es in Lösung seine Wirkung auf diese Entfernung beibehielt,
2. daß seine Wirkung allmählich an Intensität verliert (dies zeigten auch die unbeständigen Befunde an den Grenzdosen — 1 bis $^1/_2$%ig — bei Verwendung von alt- und frischbestrahltem Ergosterin).
3. daß es in besonderer Beziehung zum Epithelwachstum steht (dies zeigten sowohl die geförderten, als auch die

leicht geschädigten, oben beschriebenen Wachstumsformen (Seite 8).

c) in Form von Vigantol:

Diese Handelsware, die durch ihren hohen Vitamin D-Gehalt therapeutische Bedeutung besitzt, wurde in mehreren Serien in gleicher Versuchsanordnung, mit Sesamöl zu 1%iger Lösung verdünnt, auf eine ähnliche Wirkung geprüft, um bei seiner Verwendbarkeit für die Versuche das reine Vitamin D entbehren zu können.

Sein Einfluß aus der Tiefe des Hohlschliffs brachte wohl vereinzelt die oben beschriebenen Wachstumsformen hervor, ließ aber bei gleicher Konzentration sehr unregelmäßige Reihen entstehen: von sofortiger Nekrose bis zu leichter Wachstumsvergünstigung, sodaß man den Eindruck gewann, als ob Nebenwirkungen auftraten, die vielleicht in der Herstellung des Vigantols begründet sein könnten. Da es auch bei stärkerer Verdünnung in unbeständiger Weise wirkte, wurden weitere Versuche damit unterlassen.

Diese Reihen bestätigten aber die eigenartige Beeinflussung des auch darin enthaltenen wirksamen Faktors, indem sie vereinzelt dieselben Wachstumstypen enthielten, wie die Versuchsreihen mit reinem Vitamin D.

2. Mit vitaminhaltigen Oelen:

Das lipoidlösliche Vitamin D oder der vitamin-ähnlich-wirkende Faktor von Sesamöl und Leinöl sollte in den folgenden Versuchen in bestrahltem und unbestrahltem Zustand auf ihren biologisch wirksamen Gehalt geprüft werden:

a) bestrahltes und unbestrahltes Sesamöl:

Schon als Lösungsmittel von unbestrahltem und bestrahltem Ergosterin erwies sich das Sesamöl, ohne selbstbestrahlt zu sein, als wirkungslos. Auch bei der Nachprüfung war keinerlei Beeinflussung der wachsenden Kultur festzustellen.

In schroffem Gegensatze dazu stand wieder die Wirkung eines Tropfens aus der Tiefe des Hohlschliffs von frisch-bestrahltem Sesamöl: sofortige Nekrose ohne Reaktion; von älterbestrahltem Sesamöl: verzögerte Nekrose nach anfänglicher Reaktion. Nach Verdünnung mit unbestrahltem Sesamöl auf die Hälfte waren die Kulturen bei sorgfältigem Vergleich mit den Kontrollen etwas besser gewachsen. Eine Wachstumssteigerung im Sinne des auf Seite 12 beschriebenen Wachstumstypus war nicht zu erzielen.

Diese Versuche haben ergeben, daß auch Sesamöl oder ein Bestandteil desselben nach der Bestrahlung ähnlichen, aber nicht so deutlichen Einfluß auf wachsendes Gewebe in vitro ausübt.

b) bestrahltes und unbestrahltes Leinöl:

Eine Fernwirkung des unbestrahlten Leinöls auf die photographische Platte, die durch einfache Sonnenbestrahlung verstärkt werden kann, wurde von Haffner u. Pulewka (s. Lit.Verz.) beschrieben, sie sollte zu den bisher gefundenen Versuchsergebnissen in Beziehung gesetzt, und auch in der Gewebezüchtung erprobt werden; dabei wurde mit Leinöl in derselben Anordnung unbestrahlt und in gleicher Weise bestrahlt, wie mit Sesamöl, verfahren.

Das einfache unbestrahlte Leinöl machte die gleichen Erscheinungen wie das in Sesamöl gelöste Vitamin D in geeigneter Verdünnung: deutlich begünstigtes Epithelwachstum in breitbasigen geschlossenen Membranen rings um das Explantat, die nur wenig von Bindegewebszellen überragt wurden. Die Wachstumszone war größer und zeigte ein frisches, prognostisch günstigeres Aussehen.

Das künstlich bestrahlte Leinöl machte teilweise verzögerte Nekrose mit Reaktion oder hemmte das Wachstum bis auf wenige, zapfenartige, rasch verfettende, hinfällige Membranen von Epithelzellen, wie sie bei hohen Konzentrationen von Vita-

min D auftraten. Bei entsprechender Verdünnung mit unbestrahltem Leinöl vergrößerte sich die Wachstumszone und nahm allmählich den Charakter des günstigsten „Vitamintypus“ an. Bei steigender Verdünnung war charakteristischerweise eine Zunahme des Bindegewebswachstums bemerkbar. Diese Serien ließen allerdings bei gleicher Verdünnung und Menge von später verwendetem Leinöl beim Vergleich mit früher verwendetem Leinöl andere Grade der Wirkung erkennen, wobei aber die Kulturen der einzelnen Serien untereinander immer einheitliche Formen aufwiesen. Diese Unbeständigkeit bei Verwendung von Leinöl kann mit seiner veränderten Zusammensetzung durch Einwirkung von Sonnenlicht, verschiedenes Alter usw. erklärt werden.

Diese Versuche haben ergeben, daß unbestrahltes Leinöl imstande ist, in gleichem Sinne wie das in Oel gelöste Vitamin D auf das Wachstum der Gewebskulturen aus dieser Entfernung einzuwirken, und daß seine Fernwirkung ebenfalls durch Bestrahlen mit Ultraviolettlicht wesentlich verstärkt werden kann. Die durch Leinöl beeinflußten Serien enthielten sämtliche Wachstumstypen, die auch bei Verwendung von Vitamin D erhalten wurden.

V. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

1. Bestrahltes Ergosterin (Vitamin D) ist im Gegensatz zu unbestrahltem Ergosterin in öliger Lösung imstande, das Wachstum in der Gewebskultur aus der Entfernung (aus der Tiefe des Hohlschliffs) wesentlich zu beeinflussen. Diese Fernwirkung zeigte sich sowohl in einer Aenderung der Geschwindigkeit (Größe der Wachstumszone), als auch der Art des Wachstums (Verhältnis vom Bindegewebe zum Epithel).

2. Die gleichen Wachstumszonen und Wachstumsformen waren mit bestrahltem und unbestrahltem Leinöl in allerdings

wechselnder Konzentration, und bis zu einem gewissen Grade mit bestrahltem Sesamöl zu erreichen.

3. In Oel gelöstes Vitamin D und die bestrahlten Oele hatten gemeinsam, daß sie unmittelbar nach der Bestrahlung mit Ultraviolettlicht am stärksten wirkten und mit der Zeit an Intensität ihrer Wirkung verloren.

4. Die verschiedenen Grade der Wirkung (wechselnd mit der Konzentration, Menge und Zeit der zurückliegenden Bestrahlung) äußerten sich in den von den Kontrollkulturen abweichenden Wachstumstypen.

a) Der Wachstumstypus der Kontrollkulturen ohne Zusatz und mit Zusatz von Ergosterin in Kristallform und in öliger Lösung zeigte keine Unterschiede und ist auf Seite 3 beschrieben.

b) Schädigend aus der Tiefe des Hohlschliffs wirkten starke Konzentrationen von Vitamin D in Kristallen und in öliger Lösung, sowie bestrahltes Leinöl und frisch bestrahltes Sesamöl.

Die einzelnen Bilder der Nekrosen, die die verschiedenen Stufen der Schädigung erkennen lassen, sind auf Seite 7 beschrieben. Hierher gehören auch die eigenartigen, nur leicht geschädigten Kulturen, die sich bei Verwendung der Grenzdosen von Vitamin und bestrahlten Oelen ergaben, und die auf Seite 8 geschildert wurden.

c) Besseres Wachstum zeigte sich bei den Grenzdosen der schwachen Verdünnungen von Vitamin D, die zu einer Schädigung überleiteten, außerdem bei Verwendung von verdünntem, bestrahltem Leinöl, unbestrahltem Leinöl und verdünntem, bestrahltem Sesamöl.

Diese Kulturen wuchsen in der ganzen Serie etwas rascher und gingen später zugrunde, zeigten aber in der Art des Wachstums keine Verschiedenheit zu den Kontrollen.

d) Eine deutliche Wachstumssteigerung mit besonderer Begünstigung des epithelialen Wachstums ergab sich durch eine Fernwirkung von stark verdünntem, in Oel gelöstem, reinen Vitamin D, von Leinöl in bestrahltem und unbestrahltem Zustand, allerdings, wie oben erwähnt, bei jeder neuen Verwendung in anderen Konzentrationen. Die hierzu gehörigen Wachstumstypen wurden auf Seite 8 beschrieben.

VI. Besprechung der Versuchsergebnisse.

In der Gewebezüchtung wurde allgemein das Problem des Wachstums verfolgt, im besonderen auch seine Beziehung zu VITAMINEN, deren Zusammenhang damit klinisch längst bekannt ist:

Dabei fand Bisceglie, daß ein Zusatz von Vitamin A zu Leberkulturen, die auch in einfachem Plasma gezüchtet waren, einen Wachstumreiz ergab, der auch hier vorwiegend das Epithelwachstum betraf, wobei auch die Kulturen länger wie die Kontrollkulturen lebten. Es gelang ihm sogar, durch geringe Zugabe dieses Vitamins zu sterbenden Kulturen neue Wachstumsreize zu erzeugen (Burrow vermutet dabei auf Grund solcher Beobachtungen Beziehungen zum Geschwulstwachstum). Bei Zusatz von Vitamin B war eine ähnliche Wirkung nicht festzustellen.

Juhàsz-Schäffer setzten dem Nährmedium von Leberkulturen Weizenöl zu und erreichten damit ebenfalls vermehrtes Epithelwachstum. Diese beobachtete Wachstumsbeschleunigung erklärten sie sich mit der Wirkung des in diesem Oel enthaltenden Vitamins E.

Katzenstein u. Knake erzielten ebenfalls eine bedeutende Wachstumssteigerung des Epithels mehrerer Gewebe in der Gewebskultur durch Zugabe kleiner Mengen vitaminhaltiger Substanzen, wie Oel, Cholesterin, Galle und Eidotter. Sie be-

zogen diesen Einfluß allerdings auf die Oberflächenaktivität der geprüften Stoffe.

Die Resultate dieser Untersuchungen an Gewebskulturen bestätigen die große Rolle der Vitamine beim Wachstum. Sie haben gemeinsam, daß sie eine allgemeine und besonders epitheliale Wachstumsbeschleunigung hervorrufen, dabei handelt es sich nur um lipoidlösliche Vitamine (Vit. A und E) oder solche Vitamine enthaltende Substanzen. Diese Ergebnisse stimmen mit den hier geschilderten Beobachtungen mit Vitamin D vollkommen überein.

Eine Fernwirkung oder ein Zusammenhang dieser Wirkung mit Bestrahlung durch Ultraviolettlicht wurde nicht geprüft. Zu diesen Erscheinungen läßt sich vielleicht eine Beziehung derartiger Substanzen aus einer Untersuchung von Haffner und Pulewka (Ueber die Photoaktivierung des Lebertrans) erkennen. Haffner hat im Experiment nachgewiesen, daß bestrahltes Ergosterin im Gegensatz zu unbestrahltem, Lebertran und Leinöl eine darüber befindliche, photographische Platte schwärzen. Diese Schwärzung konnte durch vorherige kurze Bestrahlung von Lebertran und Leinöl mit einfachem Sonnenlicht verstärkt werden, und war durch einen dazwischen geleiteten Luft- oder Kohlensäurestrom abblenkbar. Er hält diese Erscheinung für eine Wirkung von flüchtigen Peroxyden, die dabei mehrfach chemisch nachgewiesen wurden. Diese Peroxyde könnten auch der Ausdruck einer katalysatorischen Wirkung auf andere Oxydationsvorgänge sein (Haffner), sodaß man bei der biologischen Wirkung an einen oxydaseartigen Einfluß von „peroxydierten“ Lipoidsubstanzen denken könnte.

Einerseits können diese Vorgänge und ihre Erklärung mit den hier erwähnten Befunden, wie Fernwirkung und der Zusammenhang ihrer Intensität mit vorheriger Bestrahlung durch U.V.Licht vollkommen in Einklang gebracht werden. Andererseits stimmen die Folgen auf das Wachstum, mit der Wirkung

der lipoidlöslichen Vitamine A und E und der vitaminhaltigen Stoffe ebenso vollkommen überein.

(Die Untersuchung dieser Vitamine in der hier angewendeten Versuchsanordnung würde wesentlich schwerer von Nebenwirkungen freizuhalten sein, als bei Vitamin D, das durch die Herstellung nach Windaus in reinster Form zu verwenden war.)

FERNWIRKUNG ist eine an Gewebskulturen mehrfach beobachtete Erscheinung.

Nach Rajewski und Dessauer sind die Gurwitsch'schen mitogenetischen Strahlen auf physikalischem Wege einwandfrei bewiesen, trotzdem sind diese Angaben neuerdings durch Seyfert (s. Lit.-Verz.) stark eingeschränkt worden. Auch hier wird die Vermutung erörtert, ob es sich um dem U.V.-Licht verwandte Strahlen handle.

V. Möllendorf stellte eine vom Säugetier auf Bindegewebskulturen ausgehende strahlenartige, abtötende, bzw. bei schwacher Dosierung hemmende Fernwirkung fest. Die Qualität dieser Strahlen ist physikalisch noch nicht bestimmt.

E. Fischer hält die Strahlenemission für eine allgemeine biologische Erscheinung, die bei starker Intensität hemme und bei schwacher Dosierung Zellteilungsvorgänge fördere. Er erklärt, es sei durch mehrere Versuche wahrscheinlich gemacht worden, daß es sich dabei um eine Art ultravioletter Strahlung handle. Sie ginge hauptsächlich von nekrotischen Partien maligner Geschwülste aus. Er nimmt an, es seien die Folgen eines proteolytischen Prozesses.

Guillery erkannte eine Fernwirkung auf wachsende Gewebskulturen bei Verwendung von Embryonalbrei. Auch hier wäre an die Annahme von E. Fischer zu erinnern, daß proteolytische Prozesse Strahlenemission zur Folge hätten. Bei derartigen Strahlenwirkungen wird eine physikalische Verwandtschaft zum U.V.-Licht vermutet.

Die Frage, ob es sich dabei um einen chemischen oder physikalischen Vorgang handelt, besteht hier ebenso, wie bei ultravioletbestrahlten Lipoidsubstanzen. Zu ihrer biologischen Wirkung wäre hier die Erklärung von Guillery zu erwähnen: Chemische Vorgänge sind zur Bildung von Strahlen befähigt und auch umgekehrt, sei deren Einfluß auf biologisch-chemisches Geschehen vorhanden.

Die mutmaßlichen Zusammenhänge von Wachstum und U.V.-Licht sind öfter erwähnt worden, ebenso die Beziehungen von Wachstum und Vitaminen. Dietrich hat auf häufig, im histologischen Schnitt aufzufindende Anhäufungen von Lipoidsubstanzen in der Umgebung von nekrotischen Bezirken (proteolytische Prozesse) und in der Nähe regeneratorisch gewucherter Epithelien hingewiesen. Einerseits wäre auf Grund der mehrfach in Gewebskulturen beobachteten Fernwirkung und der Dietrich-Sander'schen Versuche eine physiologische Aufgabe dieser Lipoidanhäufungen zu vermuten, die sich vielleicht auf eine katalysatorische Tätigkeit beschränkt. Andererseits wäre daraus und vor allem auf Grund der einheitlichen Ergebnisse in der Gewebezüchtung verschiedener Autoren eine Beziehung zwischen Epithelwachstum und lipoidlöslichen Vitaminen anzunehmen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Pathologischen Institut in Tübingen ausgeführt. Herrn Professor Dr. Dietrich bin ich für sein freundliches Interesse und für die Ueberlassung des Materials in bestem Dank verbunden. Die geschilderten Versuche wurden unter Mitarbeit von Herrn Professor Dr. Nordmann durchgeführt. Für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine mir äußerst wertvollen, fachmännischen Ratschläge möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen.

Die Reindarstellung des bestrahlten Ergosterins erfolgte am Pharmakologischen Institut in Tübingen. Dafür bin ich Herrn Professor Dr. Haffner, der die Arbeit durch seinen fördernden Rat wesentlich beeinflußte, sowie Herrn Dr. Thomä herzlich dankbar.

Literatur-Verzeichnis.

Bisceglie, Arch. f. Entw.-mechan. 106.

Burrow, zit. n. Bisceglie u. Juhász-Schäffer.

Dessauer, Arch. f. exper. Zellforschg. [illegible] (Lichtwirkung).

Dietrich u. Sander, Virchow's Arch. Bd.

Fischer, E., Klin. Wschr., 45, 1931.

Guillery, Virchow's Arch. 270, 311.

Haffner u. Pulewka, Klin. Wschr. 1925, 45.

Katzenstein u. Krake, Zeitschr. f. Krebsforschg. [illegible]

v. Möllendorf, Freiburger Med.Ges. W.-S. 31/32.

Nordmann, Arch. f. exper. Zellforschg. 8.

Rajewsky, zit. n. Dessauer.

Seydert, unter Geiger, Dissertation S.-S. 1931, Tübingen.

Warburg, Wind u. Negelein, Klin. Wschr. 1925, 829.

Windaus, Klin. Wschr. 1927, 666.

Lebenslauf.

Am 5. Mai 1907 wurde ich, Kurt Hörger, als Sohn des damaligen Stadtschultheißen von Löwenstein, Wilhelm Hörger, in Heilbronn a. N. geboren. Ich besuchte 3 Jahre lang die Lateinschule in Backnang und Balingen, dann die Oberrealschule in Tübingen, wo ich im Februar 1926 die Reifeprüfung ablegte. Ich widmete mich dem Studium der Medizin, bestand im Frühjahr 1929 die ärztliche Vorprüfung in Tübingen und studierte anschließend an den Universitäten Wien und Kiel, bezog dann wieder die Universität in Tübingen und bestand im Juli 1932 hier das medizinische Staatsexamen.